

COPYRIGHT: 1992, JPO & Japio
PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

04218000

August 7, 1992

MODIFIED POLYPEPTIDE

INVENTOR: MIKAYAMA TOSHIBUMI; KADOYA TOSHIHIKO; KAKIYA MAKOTO; INOUE HIDEO

APPL-NO: 02250460

FILED-DATE: September 21, 1990

PRIORITY: February 13, 1990 - 02 32273, Japan (JP); August 22, 1990 - 02222353, Japan (JP)

ASSIGNEE-AT-ISSUE: KIRIN AMGEN INC

PUB-TYPE: August 7, 1992 - Un-examined patent application (A)

PUB-COUNTRY: Japan (JP)

IPC-MAIN-CL: C 07K015#14

IPC ADDL CL: A 61K037#2, C 07K003#8, C 07K013#0

CORE TERMS: il-6, glycoprotein, polypeptide, formula, amino group, amino acid, bonding, alkyl

ENGLISH-ABST:

PURPOSE: To provide modified IL-6 which is prepared by bonding polyethylene glycol to glycoprotein or polypeptide having IL-6 activity, and of which the thrombopoiesis accelerating activity it is administrated to organism, is improved.

CONSTITUTION: Polyethylene glycol is bonded to glycoprotein or polypeptide having interleukin 6 (IL-6) activity, preferably human IL-6 having an amino acid sequence of formula I, through the free amino group or free carboxyl group of the amino acid residue of the glycoprotein or polypeptide. The bonding is performed through succinyl imide or triazine, and the hydrogen atom of the amino group is preferably substituted with an group of formula II ((n) is 7-600; R (1) is 1-3C alkyl), or formula III (R (2) is 1-3C alkyl).

⑫ 公開特許公報(A) 平4-218000

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)8月7日

C 07 K 15/14
A 61 K 37/02
C 07 K 3/08

A B Y

7731-4H
8317-4C
7731-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全15頁)

⑮ 発明の名称 修飾ポリペプチド

⑯ 特 願 平2-250460

⑰ 出 願 平2(1990)9月21日

優先権主張 ⑱ 平2(1990)2月13日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平2-32273

㉑ 発 明 者 三 箇 山 俊 文 群馬県前橋市総社町1-2-2 キリンビール株式会社医
薬開発研究所内㉒ 発 明 者 門 屋 利 彦 群馬県前橋市総社町1-2-2 キリンビール株式会社医
薬開発研究所内㉓ 発 明 者 柿 谷 誠 群馬県前橋市総社町1-2-2 キリンビール株式会社医
薬開発研究所内㉔ 出 願 人 キリン・アムジェン・ アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、サウザンド・
インコーポレーテッド オークス、オーク・テラス・レイン・1900

㉕ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

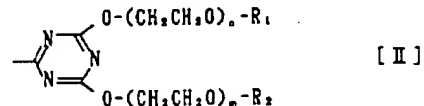
修飾ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1. インターロイキン6活性を有する糖蛋白質ま

たはポリペプチドにポリエチレングリコールを
結合してなる修飾インターロイキン6。2. ポリエチレングリコールが糖蛋白質またはポ
リペプチドのアミノ酸残基の遊離アミノ基を介
して結合している請求項1記載の修飾インター
ロイキン6。3. 糖蛋白質またはポリペプチドの少なくとも1
個の遊離アミノ基の水素原子が式【1】、(式中、n は7 ないし 600の正の整数を、R₁は
炭素数1 ないし 3のアルキル基を示す。)

または式II、

(式中、n, mは同一または異なる7 ないし600の
正の整数を、R₁, R₂は同一または異なる炭素数
1 ないし 3のアルキル基を示す。)を有する基で置換された請求項2 記載の修飾イ
ンターロイキン6。4. ポリエチレングリコールが糖蛋白質またはポ
リペプチドのアミノ酸残基の遊離カルボキシル
基を介して結合している請求項1 記載の修飾イ
ンターロイキン6。5. 糖蛋白質またはポリペプチドが実質的に下記
のアミノ酸配列を有するヒトインターロイキン
6である請求項1 記載の修飾インターロイキン
6。ALA PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS
ASP VAL ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU

THR SER SER GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE
 ARG TYR ILE LEU ASP GLY ILE SER ALA LEU
 ARG LYS GLU THR CYS ASN LYS SER ASN MET
 CYS GLU SER SER LYS GLU ALA LEU ALA GLU
 ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS MET ALA GLU
 LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY PHE ASN
 GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE THR
 GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU
 TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU
 GLU GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR
 LYS VAL LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS
 ALA LYS ASN LEU ASP ALA ILE THR THR PRO
 ASP PRO THR THR ASN ALA SER LEU LEU THR
 LYS LEU GLN ALA GLN ASN GLN TRP LEU GLN
 ASP MET THR THR HIS LEU ILE LEU ARG SER
 PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER SER LEU ARG
 ALA LEU ARG GLN MET

6. ポリペプチドが大腸菌によって生産されたヒトインターロイキン6ポリペプチドである請求項5記載の修飾インターロイキン6。

は急性期反応の制御²⁾などを総合したものである。

- 1) Garman, R.D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 84:7629, 1987.
- 2) Van Snick et al., J.Exp.Med., 165:641, 1987.
- 3) Gauldie, J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 84:7251, 1987.
- 4) Seed, B. and Aruffo, A., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84:3365, 1987.
- 5) Ikebuti, K., 実験医学, 第7巻, No.1:31, 1989.
- 6) Andus, T. et al., 実験医学, 第7巻, No.1:37, 1989.

また造血細胞系への作用に関しては、最近報告された血小板形成促進作用も、本発明のIL-6活性として挙げることができる(Ishibashi, T. et al., BLOOD, 74, No.4, 1989)。抗ガン剤を高投与された担ガン患者においては血中の血小板数が極度に低下することがあり、このような場合血小板数低下に起因する種々の障害、例えば異常出血

7. 請求項1～6のいずれか1項の修飾インターロイキン6を有効成分として含有する血小板形成促進剤。

8. インターロイキン6活性を有する糖蛋白質またはポリペプチドにポリエチレングリコールを結合させることを特徴とする修飾インターロイキン6の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、インターロイキン6（以下IL-6という）活性を有する糖蛋白質またはポリペプチドにおいて、ポリペプチド分子中の少なくとも1個のアミノ基またはカルボキシル基を化学修飾して得られる化学修飾IL-6、その製造方法、およびこの化学修飾IL-6の血小板形成促進剤としての用途に関する。

ここでIL-6活性とは、Bリンパ球の最後の分化に関わる活性であり、同時にTリンパ球¹⁾、形質細胞・多発性骨髄腫細胞²⁾、肝細胞³⁾、神経細胞⁴⁾、造血幹細胞⁵⁾の細胞系列に対する刺激作用あるいは

（出血過多等）がおこり易くなる。IL-6の血小板形成能は、これらの抗ガン剤の投与に伴う副作用を軽減させることが期待される(McNiece, I.K. et al., Exp.Hematol., 16:807, 1988)。本発明の化学修飾IL-6は、既知のIL-6活性を有する糖蛋白質またはポリペプチドより優れた機能を有しており、医薬品として利用できる。

〔従来の技術〕

IL-6活性を有する糖蛋白質またはポリペプチドの一例として、ヒトIL-6（以下hIL-6という）の製造技術については、既に多くの報告がある。例えば、遺伝子組換え技術によらない方法としては、ヒトT細胞とヒト癌細胞とのヒトT融合細胞による生産方法(Okada et al., J.Exp.Med., 157:583, 1983)、あるいはヒトT細胞白血病ウイルスにより形質転換されたヒトT細胞による生産方法(特開昭61-115024号)が挙げられる。また遺伝子組換え技術による方法としては、hIL-6をコードするDNAにより形質転換された哺乳動物細胞あるいは細菌による生産方法も確立されている

(特開昭63-42688号、特開昭63-157996号、特表平1-503354号)。これらの方法で生産されるhIL-6は、生産細胞が哺乳動物細胞である場合には糖蛋白質として、細菌細胞である場合にはポリペプチドとして、それぞれ生産されるが、いずれのものもIL-6活性を有している(特開昭63-42688号、特開昭63-157996号、特表平1-503354号)。

hIL-6のcDNA塩基配列より決定した成熟ポリペプチド部分は本来184個のアミノ酸残基からなっているが、そのN末端において1以上のアミノ酸残基の付加あるいは27アミノ酸残基の欠失があるもの、またはそのC末端において約50アミノ酸残基の欠失(あるいは有害とならない位置)があるものも、依然として活性を有していることが知られている(特開昭63-157996号、特表平1-503354号、欧州特許公開0363083号、Brakenhoff, J.P.J., J. Immunol., 143:175, 1989)。

一般に高分子のポリペプチドを医薬として用いる場合にその血中滞留時間を増加させるための方法としては、ポリエチレングリコール化、デキス

トラン修飾、グルタミン酸とリジンのポリマー化、プルラン化、ガンマグロブリン化、ポリアスパラギン酸誘導体修飾⁹⁾、スマンクス化¹⁰⁾、脂肪酸修飾¹¹⁾などが知られている。またアスパラギナーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、ウリカーゼなどのヒト以外の由来の酵素類について、ポリエチレングリコールで化学修飾を行うことにより血中クリアランス値の延長が認められている。

7) Liu, F.T. et al., Biochemistry, 18:690, 1979.

8) Okada, M. et al., Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 66:189, 1981.

9) 前田浩ら、癌と化学療法、11:814, 1984.

10) Sagawa, A. et al., Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 76:79, 1985.

【発明が解決しようとする課題】

IL-6を生体に投与した場合、血中半減期が非常に短いことが明らかとなっている(Castell, J.V. et al., Eur. J. Biochem., 177:357, 1988)。したがって、IL-6の血中での半減期を延長させ、

その薬効の持続をはかることが望ましいが、しかしながら、そのような性質を持つIL-6活性を有する分子は、いまだ開発されていない。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、IL-6活性を有するポリペプチドの分子中の少なくとも1個のアミノ基を化学修飾することにより、未修飾のIL-6に比較して生体内に投与される際の血小板形成促進活性が増強されることを見出し、この知見を基礎として本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、霊長類、特にヒトにおけるIL-6活性を有する糖蛋白質またはポリペプチド(好ましくはポリペプチド)にポリエチレングリコール(以下、PEGという)を結合してなる化学修飾IL-6、その製造方法、およびこの化学修飾IL-6の血小板形成促進剤としての用途に関するものである。

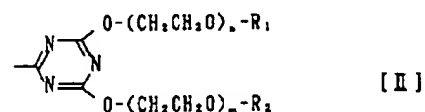
以下に本発明を詳細に説明する。

IL-6活性を有する分子にPEGを結合させる態様としては、ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介する態様と、アミノ酸のカルボキシル基を介

する態様があり、いずれでもよいが、特に前者が好ましい。このアミノ基を介する態様においては、IL-6活性を有する分子中の少なくとも1個のアミノ基の水素原子を、以下に示す式【I】または式【II】で表される基で置換する。



(式中、nは7ないし600の正の整数を、R₁は炭素数1ないし3のアルキル基を示す。)



(式中、n, mは同一または異なる7ないし600の正の整数を、R₁, R₂は同一または異なる炭素数1ないし3のアルキル基を示す。)

本発明におけるIL-6活性を有する糖蛋白質あるいはポリペプチドとして好ましいのは、実質的に次のアミノ酸配列を有するヒトIL-6であり、その

生産にあたっては、遺伝子組換えによる方法あるいはそれによらない方法のいずれをも用いることができる。

ALA PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS
ASP VAL ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU
THR SER SER GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE
ARG TYR ILE LEU ASP GLY ILE SER ALA LEU
ARG LYS GLU THR CYS ASN LYS SER ASN MET
CYS GLU SER SER LYS GLU ALA LEU ALA GLU
ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS MET ALA GLU
LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY PHE ASN
GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE THR
GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU
GLU GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR
LYS VAL LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS
ALA LYS ASN LEU ASP ALA ILE THR THR PRO
ASP PRO THR THR ASN ALA SER LEU LEU THR
LYS LEU GLN ALA GLN ASN GLN TRP LEU GLN
ASP MET THR THR HIS LEU ILE LEU ARG SER

G. et al., Eur. J. Biochem., 159:625, 1986) を参考に、Souzaらの方法(特表昭63-500636号)に準じて、hIL-6のアミノ酸配列をコードするDNAを化学合成し、大腸菌に組み込み発現させて得ることができる。

本発明に用いられる化学修飾基に関し、上式中、 m 、 n はそれぞれの平均値を示す。 m および n は同一でも異なってもよいが、 m と n が同一であって約7ないし600、好ましくは約7ないし250、さらに好ましくは約30ないし150であるのがよい。本発明で用いられるPEGとしては、平均分子量300ないし30000のものが好ましい。中でも平均分子量1000ないし20000のものがさらに好ましい。上式中、 R_1 、 R_2 、で示される水酸基の保護基としては、例えば炭素数1ないし3のアルキル基(例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基など)が挙げられ、とりわけメチル基が好ましい。

IL-6活性を有するポリペプチド(以下IL-6ポリペプチドという)のアミノ基をPEGで修飾する

PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER SER LEU ARG
ALA LEU ARG GLN MET

ここで「実質的」とは、アミノ酸配列が同一である場合のほかに、天然hIL-6タンパクとの間に有害な機能的非類似性を生じさせないような1以上のアミノ酸変化(すなわち欠失、付加、挿入、置換)を含みうることを意味する。このようなアミノ酸変化の例としては、前述の従来技術に挙げたhIL-6(特開昭63-157996号、特表平1-503354号および欧州特許公開0363083号参照)がある。

それらの中でも、遺伝子組換え大腸菌により産生されたhIL-6が、純度よく均質大量に入手できるので好ましい。特に、前記アミノ酸配列あるいはそのN末端にメチオニン残基又はメチオニソーリジン・ジペプチドが付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがさらに好ましい。

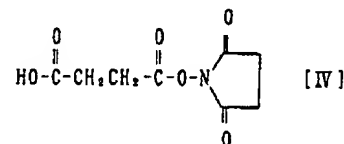
上記のhIL-6は、例えば特表平1-503354(ジェネティックス・インスティテュート・インコーポレイテッド)に開示の方法に従い得ることができ、またhIL-6遺伝子の塩基配列(例えばHaegeman,

には、PEGをスクシニルイミドを介して結合させる方法(式[I])とトリアジンを介して結合させる方法(式[II])との2種類の方法が考えられるが、前者がより好ましい。

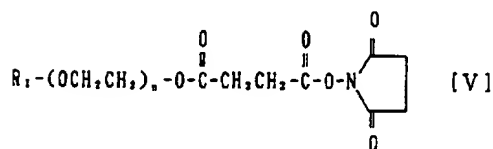
スクシニルイミドを介する修飾方法としては、一般式



(式中、 n および R_1 は前記と同じ意味である)で表されるPEGと、式



で表される化合物を反応させ、



(式中、 n および R_1 は前記と同じ意味である)で

表される化合物を得、ついでこれにIL-6ポリペプチドを反応させることにより行われる。化合物[Ⅲ]と[Ⅳ]を反応させ[Ⅴ]を得る操作は、ほぼ100%反応の終了した形態で化学試薬活性型PEG(日本油脂)として販売されているため、これを使用することができる。

活性型PEGすなわち化合物[Ⅴ]とIL-6ポリペプチドを反応させ、修飾IL-6を得るためには、例えば0.25M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH8.0-8.5)中で化合物[Ⅴ]と4℃で1時間～2時間反応させる。この場合、活性型PEGの分解を避けるために、活性型PEGを数度に分けて添加してもよい。反応終了後、修飾IL-6を得るため、例えば水溶液中でのゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーを用いて未反応の化合物[Ⅴ]および未反応のIL-6ポリペプチドを分離除去する。次にトリアジンを経して修飾する方法としては、一般式

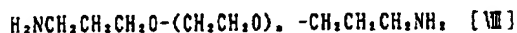


(式中、n およびR₁は前記と同じ意味である)

ペプチドを反応させ、修飾IL-6を得るためには、例えば0.25M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH10.0)中で化合物[Ⅲ]と4℃～室温で2～20時間反応させる。この場合、活性型PEGの分解を避けるために、数度に分けて活性型PEGを添加してもよい。反応終了後、修飾IL-6を得るため、例えば水溶液中でのゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーを用いて未反応の化合物[Ⅲ]および未反応のIL-6ポリペプチドを分離除去する。

IL-6ポリペプチドのカルボキシル基をPEGで修飾するには、例えば、

一般式



(式中、n は前記と同じ意味である)

で表される活性PEGを反応させればよい。

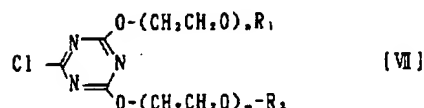
本発明のPEG修飾IL-6は、マウスに投与した時、もとの未修飾のIL-6ポリペプチドあるいは糖鎖の付加したIL-6よりもはるかに優れた血小板増加活性を有し、しかも毒性は低いので血小板形成促進剤として有効に用いることができる。

で表されるPEGと、

式



で表される化合物を反応させ、一般式



(式中、n, m は同一または異なる7ないし600の正の整数を、R₁, R₂は同一または異なる炭素数1ないし3のアルキル基を示す。)

で表される化合物を得、ついでこれにIL-6ポリペプチドを反応させることにより行われる。化合物[Ⅲ]と[Ⅵ]を反応させ[Ⅶ]を得る操作は、ほぼ100%反応の終了した形態で化学試薬(生化学工業)活性型PEGとして販売されているため、これを使用することができる。

活性型PEGすなわち化合物[Ⅶ]とIL-6ポリ

本発明のPEG修飾IL-6を血小板形成促進剤として用いるには、例えば哺乳動物の各種急性もしくは亜急性の血球低下の治療を目的として経口的もしくは非経口的に投与する。

投与するにあたっては、PEG修飾IL-6を薬理的に許容しうる賦形剤、希釈剤などと混合し、それ自体公知の方法で、すなわち経口剤として例えば錠剤、カプセル剤として、あるいは注射剤として上記哺乳動物に投与する。

PEG修飾IL-6の1日投与量は、修飾IL-6中のタンパク質量として約5 μg ないし500mg/ヒト、さらに好ましくは約200 μg ないし50mg/ヒトとなる修飾IL-6の量である。

(実施例)

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するがこれらの実施例は本発明の範囲を何ら制限するものではない。

実施例1

hIL-6 遺伝子の塩基配列(例えばHaegeman, G. et al., Eur. J. Biochem., 159:625, 1986)を参

考に、Souzaらの方法（特表昭63-500636号）に準じて、下記のアミノ酸配列をコードするDNAを化学合成し、大腸菌に組み込み発現させた。

MET ALA PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER
 LYS ASP VAL ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO
 LEU THR SER SER GLU ARG ILE ASP LYS GLN
 ILE ARG TYR ILE LEU ASP GLY ILE SER ALA
 LEU ARG LYS GLU THR CYS ASN LYS SER ASN
 MET CYS GLU SER SER LYS GLU ALA LEU ALA
 GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS MET ALA
 GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY PHE
 ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE
 THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU
 GLU TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER
 GLU GLU GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER
 THR LYS VAL LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS
 LYS ALA LYS ASN LEU ASP ALA ILE THR THR
 PRO ASP PRO THR THR ASN ALA SER LEU LEU
 THR LYS LEU GLN ALA GLN ASN GLN TRP LEU
 GLN ASP MET THR THR HIS LEU ILE LEU ARG

生成物をPBS（リン酸緩衝食塩水）で平衡化したゲル濾過カラムに適用して緩衝液交換を行い、以下の分離操作に供した。

ゲル濾過後のサンプル3.5mlを高速度液体クロマトグラフィーのゲル濾過用カラムに適用した。1分子ないし3分子のPEGが1分子のhIL-6に結合したPEG修飾IL-6ポリペプチドは第一ピークに溶出され、その収量は20 μ gであった。

上記の分離工程で得られた第一ピークのPEG修飾hIL-6ポリペプチドを、PEG（4500）IL-6と呼ぶ。

実施例2

実施例1で作製したPEG（4500）IL-6の特徴付けをSDS-PAGEによる分子量の推定によって行った。

反応物の分子量測定は、SDS-PAGE（ファーストシステム：ファルマシア社製、10-15%グラジエントゲル、銀染色）上で行った。分子量マーカーには、バイオラッド社製を使用した。SDS-PAGEの結果を第1図に示す。PEG（4500）IL-6の見かけ

SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER SER LEU
 ARG ALA LEU ARG GLN MET

上記hIL-6を菌体内に蓄積した大腸菌の細胞を、3500 \times gで10分間遠心分離して300g回収し、特開昭63-157996号の方法に従ってhIL-6の抽出、可溶化、リフォールディングを行い、hIL-6約2.9gを得た。得られたhIL-6をSDS-PAGEで調べたところ、単一バンドであり、かつアミノ酸組成から計算された分子量21Kとほぼ一致していた。

PEGとしては、平均分子量が約4500のPEGのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドにより活性化したN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコール（サンブライトM-4101、日本油脂製）（以下活性型PEG1という）を使用した。

hIL-6の200 μ gを0.25Mホウ酸ナトリウム緩衝液（pH8.5）370 μ l中で、活性型PEG1.5mgと4 $^{\circ}$ Cで2時間反応させ、2N塩酸でpHを低下させて反応を停止した。活性型PEGの量は、hIL-6の遊離アミノ基の量に対して2倍量を用いた。

上の分子量は（結合数の少ないものから）23K、37K、50Kであった。

実施例3

修飾に用いたIL-6ポリペプチドは、実施例1に示したものと同一である。PEGは、平均分子量5,000のポリエチレングリコールモノメチルエーテル2分子と塩化シアヌルより合成された平均分子量10000の活性型ポリエチレングリコール（Activated PEG2、生化学工業社製）（以下活性型PEG2という）を使用した。hIL-6の200 μ gを0.25Mホウ酸ナトリウム緩衝液（pH10.0）370 μ l中で活性型PEG23.5mgと室温で2時間反応させ、2N塩酸によってpHを低下させて反応を停止した。活性型PEG2の量は、hIL-6の遊離アミノ基の量に対して約2倍量を用いた。生成物をPBSで平衡化したゲル濾過カラムに適用して緩衝液交換を行い実施例1と同様の分離操作の後、1分子ないし2分子のPEGが結合したIL-620 μ gを分離し、生理活性測定用のサンプルとして使用した。

実施例2と同様にSDS-PAGE上にて分子量の推定

を行ったところ、その分子量は 28K、42Kであった。(第1図参照) 上記の分離操作で得られた第一ピークのPEG修飾hIL-6をPEG (10000) IL-6と呼ぶ。

実施例 4

(1) hIL-6 遺伝子の塩基配列 (例えばHaegeman, G. et al., Eur. J. Biochem., 159:625, 1986) を参考に、Souzaらの方法 (特表昭63-500636号) に準じて、下記のアミノ酸配列をコードするDNAを化学合成し、大腸菌に組み込み発現させた。なお、このアミノ酸配列の特徴として、そのN末端のアミノ酸配列がMet Lys Ala Pro... となっており、後述するようにカテプシンC処理によりMet Lys を切除することによって、N末端がAlaから始まるhIL-6を製造できる。

MET LYS ALA PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP
SER LYS ASP VAL ALA ALA PRO HIS ARG GLN
PRO LEU THR SER SER GLU ARG ILE ASP LYS
GLN ILE ARG TYR ILE LEU ASP GLY ILE SER
ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS ASN LYS SER

位加えて、室温で1時間混合した。急冷した後、最終2mMになるようにリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を添加し、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーで処理した。ヒドロキシアパタイトカラムは2mM リン酸ナトリウム緩衝液 (1300mho, pH6.0) で予め平衡化しておき、同緩衝液で溶出を行ってピーク画分1200mlを分取した。次にこの画分を、CMセファロースカラムクロマトグラフィーで処理した。CMセファロースカラムは20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で予め平衡化しておき、試料を加え同緩衝液で洗浄したのち、0-0.3M NaCl、20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) の直線勾配で溶出させ、ピーク画分580 mlを分取した。

得られたピーク画分をSDS-PAGEで調べたところ、単一バンドであり、かつアミノ酸組成から計算された分子量21Kとほぼ一致していた。またアミノ酸配列分析により、予想されたN末端アミノ酸配列 (すなわち Ala Pro Val Pro...) を確認した。得られたhIL-6の収量は約1.5gであった。

ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU ALA LEU
ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS MET
ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE
ILE THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR
LEU GLU TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER
SER GLU GLU GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET
SER THR LYS VAL LEU ILE GLN PHE LEU GLN
LYS LYS ALA LYS ASN LEU ASP ALA ILE THR
THR PRO ASP PRO THR THR ASN ALA SER LEU
LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN ASN GLN TRP
LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU ILE LEU
ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER SER
LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET

上記hIL-6を菌体内に蓄積した大腸菌の細胞を、3500×gで10分間遠心分離して300g回収し、特開昭63-157986号の方法に従ってhIL-6の抽出、可溶化、リフォールディングを行なった。20mM酢酸ナトリウム緩衝液に対し緩衝液交換を行った後、カテプシンC (ベーリンガーマンハイム社) を6単

(2) 活性型PEG 1を使用して、上記(1)で調製したhIL-6のPEG修飾を行った。

0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.5) 100mlに溶解したhIL-6 (100mg) 溶液に、氷浴中で攪はんしながら、1125mgの活性型PEG 1を加えて反応させた。活性型PEG 1を全量一度あるいは5回に分けて30分毎に加えて比較したところ、分けて加えた場合の方がPEG修飾の効率が高いことが観察された。そこで以下の精製過程には活性型PEG 1を分けて加えて得た反応生成物を用いた。反応終了後、YM10限外濾過膜 (Amicon) を用いて反応液を10mlに濃縮し、これを予め20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) で平衡化したセファデックスG100カラムに適用した。同緩衝液を用いて分離を行い、SDS-PAGE分析で見かけ上の分子量91K、68K、41K、26Kを各々主バンドとする4つの画分を得た (以下、これらの画分を順に、Fr45-1、Fr45-2、Fr45-3、Fr45-4という)。各画分の収量は、それぞれ2.9mg、4.0mg、2.9mg、2.5mgであった。

実施例 5

実施例 4 で調製した 4 つの画分についての特徴付けを、未修飾アミノ基数測定および SDS-PAGE による分子量測定によって行った。

未修飾アミノ基数の測定は、Stocksらの方法 (Anal. Biochem., 154:232, 1986) に従って、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) 中で 7.5 % Fluorescamine (4-phenylspiro [furan-2(3H), 1'-phthalan] -3,3'-dione) と反応させ、蛍光強度 ($\lambda_{ex}=390nm$, $\lambda_{em}=475nm$) を測定することによって行った。

SDS-PAGEによる分子量測定は、10-20%グラジエントゲル (第一化学製) を用いて行った。なお、分子量マーカーには、ファルマシア社製 (Low Molecular Weight Marker) を用いた。蛋白質バンドの検出は CBB 染色により行った。各画分中の各バンド含量の測定は、画像処理システム Model TIF-64 (イムノメディカ社) を用いて行った。結果を第 1 表に示す。

第 1 表

画分	分子量分布 (%)					未修飾NH ₂ 基 平均個数 ^{*1}
	21K ^{*1}	26K	41K	68K	>91K	
Fr45-1				23.0	77.0	6.1
Fr45-2			14.0	52.2	33.8	6.8
Fr45-3		12.0	56.4	28.2	3.4	9.3
Fr45-4	9.9	75.7	14.4			12.6

*1 未修飾 hIL-6

*2 分子当りの平均未修飾アミノ基数
(h-IL6 1 分子上のアミノ基数は 15)

実施例 6

実施例 4 で調製した 4 つの画分について、B 細胞系白血病細胞 SKW6-CL4 に対する IgM 産生促進活性 (Hirano, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 82:7251, 1985) を測定した。結果を第 2 表に示す。化学修飾 hIL-6 は、上記 SKW6-CL4 に対する IgM 産生促進活性を有していた。

(本頁以下余白)

第 2 表

添加量 [*] (pg/ml)	産 生 Ig M (ng/ml)				
	未修飾 hIL-6	PEG 修飾 hIL-6			
		Fr45-1	Fr45-2	Fr45-3	Fr45-4
3750.0	910	250	335	175	200
937.5	890	120	162	118	175
58.5	545	82	78	70	90
7.5	120	72	73	70	75

* いずれも hIL-6 蛋白質として同一重量添加

実施例 7

遺伝子組換えにより大腸菌中で生産された実施例 1 の hIL-6 と、実施例 1 および実施例 3 でそれぞれ作製された PEG (4500) IL-6 および PEG (10000) IL-6 について、マウスへの投与による血小板増加効果を調べた。Balb/c マウス (8 週令、雌) に PEG (4500) IL-6、PEG (10000) IL-6、PEG (4500) と hIL-6 の混合物、および hIL-6 をそれぞれ蛋白量 (プロテインアッセイ、Bio-Rad 社製にて測定) として 10 μ g/マウスずつ 1 日 1 回、5 日間皮下投与し、6 日目に採血して末梢血中の

血小板数を計数した。その結果を第 2 図に示した。第 2 図において、棒線は 3 匹の標準偏差値を表し、() 内の数字は無投与群の血小板数を 100 としたときの、各サンプル投与群の血小板数の相対値を示す。

hIL-6 および hIL-6 と PEG (4500) の混合物では、いずれも対照群に比べ約 150% の血小板数の増加を示したのに対し、PEG (4500) IL-6、PEG (10000) IL-6 はいずれも約 220% の血小板数増加を示した。

実施例 8

遺伝子組換えにより大腸菌中で生産された実施例 4 の hIL-6 と、その PEG 修飾体 (Fr45-1 から Fr45-4) を、Balb/c マウス (8 週令、雌; n=4) の皮下に 1 日 1 回 5 日間投与し、最終投与翌日に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第 3 表に示した。

未修飾 hIL-6 に比べその PEG 修飾体は、明らかに有意な血小板増加効果を示した。

第3表

投与量 ^a (μ g/匹)	血小板数 (媒体投与群に対する%)				
	未修飾 hIL-6	PEG修飾hIL-6			
		Fr45-1	Fr45-2	Fr45-3	Fr45-4
10	** 126.6	*** 250.9	* 214.4	** 194.0	** 173.5
5	* 130.2	*** 224.6	*** 188.9	*** 188.9	* 144.2
1	111.1	* 143.6	* 151.5	* 128.8	124.0
0.5	115.8	** 135.4	** 125.8	** 134.4	107.2
0.1	100.4	103.2	102.0	92.8	107.6

a: いずれもhIL-6 蛋白質として同一重量投与

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ で

媒体投与群と有意の差あり。

(Student T-検定)

実施例9

(1) 遺伝子組換えにより大腸菌中で生産された実施例4のhIL-6とそのPEG修飾体(Fr45-2)を、X線照射(600rad)により血小板減少を誘発させたマウスの皮下に、1日1回、5 μ gずつ

実施例10

遺伝子組換えにより大腸菌中で生産された実施例4のhIL-6とそのPEG修飾体(Fr45-2)を、化学療法剤のサイクロフォスファミド(以下CYという)を200mg/kg投与して血小板減少を誘発させたマウスに、CY投与翌日から、hIL-6は5 μ gずつ、PEG修飾体は1 μ gずつ1日1回7日間皮下投与し、経日的に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第5図に示した。

PEG修飾hIL-6投与群では有意な血小板数の早期回復が認められたのに対し、未修飾hIL-6投与群では対照群の回復時期に血小板数の増加が認められたに過ぎなかった。

実施例11

活性型PEG2を使用して、実施例4の工程(1)で調製したhIL-6のPEG修飾を行った。

0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH10) 200mlに溶解したhIL-6(100mg)溶液に、室温で攪はんしながら、2500mgの活性型PEG2を5回に分けて30分毎に添加し反応させた。反応終了後、YM10限

10日間連続投与($n=4$)し、経日的に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第3図に示した。

未修飾hIL-6投与群での血小板の正常レベルへの回復は対照群に比べ1から2日早く認められたのに対し、PEG修飾hIL-6投与群では約5日早い回復を示した。

(2) 上記(1)と同様に、hIL-6とそのPEG修飾体(Fr45-2)をX線照射したマウス($n=5$)の皮下に、1日1回、hIL-6は5 μ gまたは50 μ g、Fr45-2は5 μ gずつ7日間連続投与し、8日目に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第4図に示した。

上記(1)の結果(第3図)よりわかるようにX線照射後8日目は媒体投与群で血小板の減少が極小値をしめす時点であるが、PEG修飾体投与群では血小板数の減少が観察されなかった。これに対し未修飾hIL-6投与群では、PEG修飾体の10倍量を投与した場合でも有意な血小板数の回復が見られなかった。

外濾過膜(Amicon)を用いて反応液を8mlに濃縮した。濃縮液3.5mlを予めPBSで平衡化したスーパーデックスG200カラム(Pharmacia)にのせ、同緩衝液を用いて溶離して5つの画分を得た(以下、これらの画分を順に、Fr100-1、Fr100-2、Fr100-3、Fr100-4、Fr100-5という)。各画分の収量は、それぞれ3.8mg、5.9mg、5.8mg、4.8mg、4.5mgであった。

得られた5つの画分について、実施例5と同様に未修飾アミノ基数を測定して特徴付けを行った。各画分の分子当りの平均未修飾アミノ基数は、順にそれぞれ5.3個、7.4個、8.6個、9.4個、10.0個であった。

実施例12

PEG化試薬として、平均分子量が約12000のPEGのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドにより活性化したN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコール(日本油脂に合成を委託)(以下活性型PEG12Mという)を使用して、実施例4の工程(1)で調製したhIL-

6のPEG修飾を行った。

0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.5) 180mlに溶解したhIL-6 (90mg) 溶液に、氷浴中で攪はんしながら、1000mgの活性型PEG12Mを3回に分けて30分毎に添加し反応させた。反応終了後、YM10限外濾過膜 (Amicon) を用いて反応液を6mlに濃縮し、これを予めPBSで平衡化したスーパーデックスG200カラム (Pharmacia) にのせ、同緩衝液を用いて溶離して5つの画分を得た (以下、これらの画分を順に、Fr120-1, Fr120-2, Fr120-3, Fr120-4, Fr120-5という)。各画分の収量は、それぞれ1.6mg、2.8mg、3.5mg、3.7mg、3.7mgであった。

得られた5つの画分について、実施例5と同様にして未修飾アミノ基数を測定して特徴付けを行った。各画分の分子当りの平均未修飾アミノ基数は、順にそれぞれ5.2個、7.6個、8.7個、9.2個、9.8個であった。

実施例13

遺伝子組換えにより大腸菌中で生産された実施

例4のhIL-6と、実施例11および12で調製したそのPEG修飾体を、Balb/cマウス (8週令、雌: n = 4) の皮下に1日1回5日間投与し、最終投与翌日に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第4表および第5表に示した。

未修飾hIL-6に比べそのPEG修飾体は、明らかに有意な血小板増加効果を示した。

(本頁以下余白)

第4表

血小板数 ^a	投与量 (μg/匹) ^b			
	10	5	1	0.5
未修飾	***	**		
hIL-6	143.0	129.4	nt	nt
Fr100-1	***			
	211.1	nt	100.0	nt
Fr100-2	***	***	**	
	250.8	205.9	148.9	107.9
Fr100-3	***	***	**	
	204.4	212.7	141.1	113.7
Fr100-4	***	**	*	**
	203.2	226.5	142.5	138.7
Fr100-5	**	**	*	
	202.4	225.9	142.8	111.3

a : 媒体投与群に対する%

b : いずれもhIL-6蛋白質として同一重量投与
nt : 未実施

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001 で

媒体投与群と有意な差あり (Student T-検定)

第5表

血小板数 ^a	投与量 (μg/匹) ^b				
	10	5	1	0.5	0.1
未修飾	*				
hIL-6	126.7	nt	nt	nt	nt
Fr120-1	*	***	**	***	**
	201.3	246.3	221.5	215.5	141.3
Fr120-2	***	***	***	***	***
	213.2	244.3	233.2	227.8	167.4
Fr120-3	***	***	***	***	***
	221.4	243.1	242.7	205.9	170.1
Fr120-4	***	***	**	***	***
	200.4	229.0	221.4	203.4	161.5
Fr120-5	***	**	**	***	***
	235.9	224.8	225.4	191.5	154.1

a : 媒体投与群に対する%

b : いずれもhIL-6蛋白質として同一重量投与
nt : 未実施

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001 で

媒体投与群と有意な差あり (Student T-検定)

実施例14

実施例9の工程(2)と同様にして、実施例12で調製したPEG修飾hIL-6 (Fr120-1 からFr120-5)をBalb/cマウス(8週令、雌; n=5)の皮下に1日1回 0.005-5 μ g ずつ7日間連続投与し、8日目に採血して末梢血中の血小板数を計数した。その結果を第6図に示した。

PEG修飾hIL-6 はいずれの画分も顕著な血小板数回復効果を示し、0.1 μ g 以上の投与量ではすべての画分で媒体投与群に比べて有意($P<0.01$)に血小板が多かった。

実施例15

本発明のPEG修飾hIL-6の血中滞留時間を推定するために、実施例4のhIL-6および実施例4および12で調製したそのPEG修飾体(Fr45-2、Fr120-1 およびFr120-2)をBalb/cマウス(8週令、雌)に蛋白量として0.2 μ g 皮下投与し、経時的に採血して血清中のhIL-6量を測定した。hIL-6の定量はQuantikine hIL-6 (R&D Systems社)を用いて免疫化学的に行った。その結果を第7図に示し

hIL-6 画分を以下Fr120'-1、Fr120'-2、Fr120'-3、Fr120'-4、Fr120'-5と呼ぶ。

実施例13の方法でマウス(n=5)に上記 Fr120-2 を1日1回1 μ g ずつ5日間投与し、最終投与翌日の末梢血中の血小板数を計数したところ、媒体投与群に対して285%の増加($P<0.001$ で有意)が観察された。

実施例17

PEG修飾したhIL-6 ポリペプチドの急性毒性を調べるために、実施例4のhIL-6 と実施例4、11および12で調製したそのPEG修飾体(Fr45-2、Fr100-2 およびFr120-2)をBalb/cマウス(6週令、雄、体重21-23g; n=5)に蛋白量として1、5あるいは10mg/kg 皮下投与し、以後観察した。どの試験群においても投与後10日目でも死亡例は認められなかった。従って本発明のPEG修飾 hIL-6の急性毒性はきわめて低く、そのLD₅₀値は10mg/kg よりも高い。

実施例18

本発明のhIL-6誘導体を生体に皮下投与するた

た。

未修飾hIL-6 が投与5時間後までには血中より消失するのに対し、PEG修飾体では投与24時間後でもhIL-6 抗原が検出され、血中滞留時間が長くなっていることが推定される。

実施例16

実施例4の工程(1)に示したアミノ酸配列を持つhIL-6を同工程に述べた方法で大腸菌中で生産し、カテプシンCで処理することなくそのままPEG修飾に用いた。得られた hIL-6 (約2.9g)はSDS-PAGE上で単一バンドであり、かつアミノ酸組成から計算された分子量21K とほぼ一致していた。N末端アミノ酸配列を調べたところ、予想された配列(すなわち MET LYS ALA PRO ...)を持つ分子が99%以上であった。またこのN末端配列は保存性に対して安定性が高く、4℃で4カ月保存した後でも全く変化が見られなかった。

こうして得られたhIL-6 ポリペプチドを、活性型PEG12MをPEG化試薬として実施例12に従ってPEG修飾した。得られた5つのPEG修飾

めに、0.1%の正常マウス血清を含むPBSに溶解し、最終投与容量が100 μ lとなるようにhIL-6誘導体の濃度を調整した。

[発明の効果]

本発明のPEG修飾IL-6は、未修飾のIL-6活性を有する糖蛋白質またはポリペプチドに比べて、生体での血中持続性が大幅に向上し、かつ顕著に優れた血小板増加作用を示している。したがって、本発明のPEG修飾IL-6は血小板産生促進剤として臨床治療上有用である。

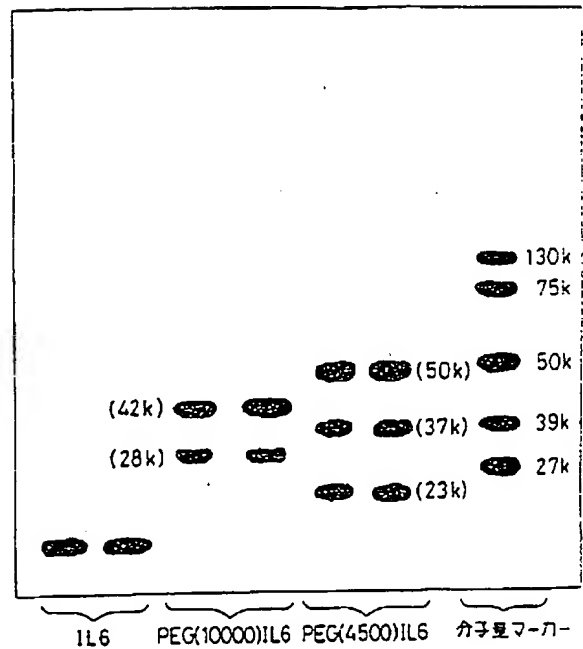
4. 図面の簡単な説明

第1図は、PEG(4500)IL-6およびPEG(10000)IL-6のSDS-PAGEの結果を示す図である。第2図は、正常マウスにおけるPEG(4500)IL-6およびPEG(10000)IL-6の血小板増加効果を示す図である。第3図、第4図は、X線誘発血小板減少マウスにおけるFr45-2の血小板回復促進効果を示す図である。第5図は、化学療法剤誘発血小板減少マウスにおけるFr45-2の血小板回復促進効果を示す図である。第6図は、X線誘発血小板減

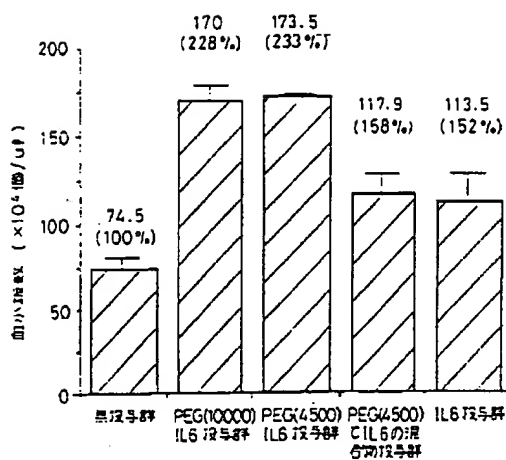
第 1 図

少マウスにおけるFr120-1 からFr120-5 の血小板回復促進効果を示す図である。第7図はPEG修飾hIL-6 のマウス血中滞留時間の延長を示す図である。

出願人 キリン・アムジエン・
インコーポレーテッド
代理人 弁理士 平 木 祐 輔
同 弁理士 石 井 貞 次
同 弁理士 早 川 康

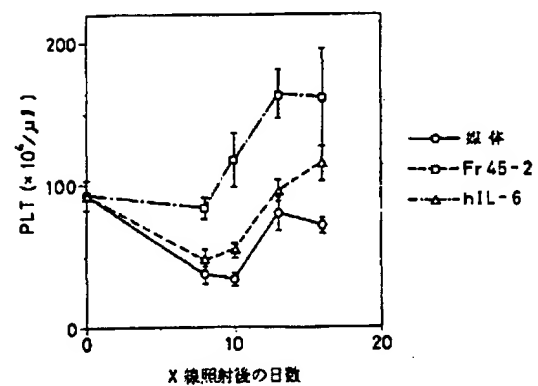


第 2 図



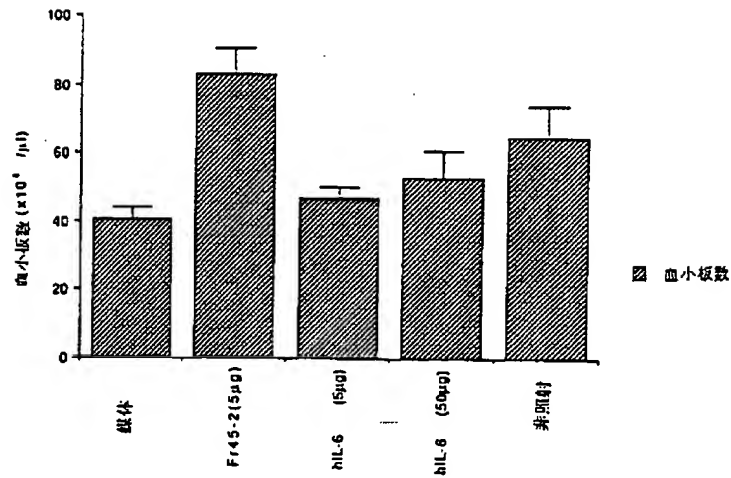
第 3 図

X線照射後の末梢血中血小板数の変化



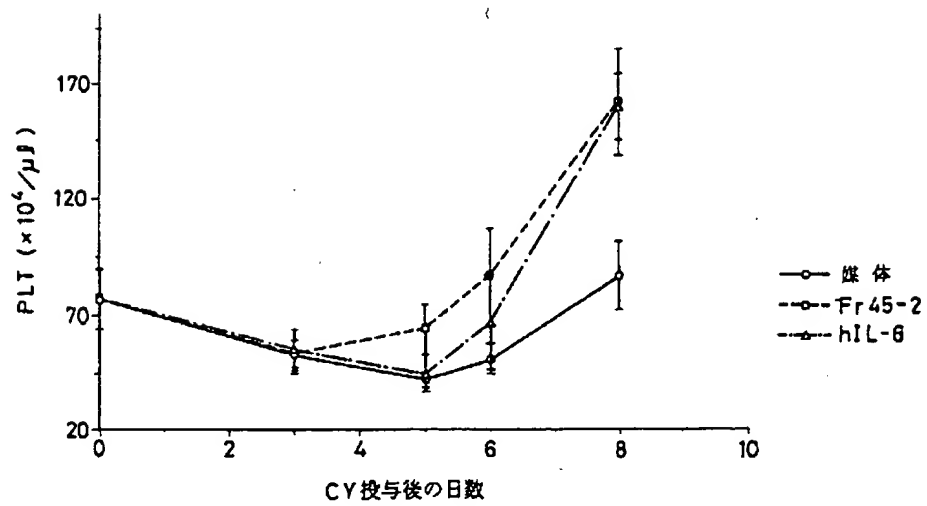
第 4 図

放射線照射マウスの血小板数に対するPEG/IL-6
およびhIL-6の効果

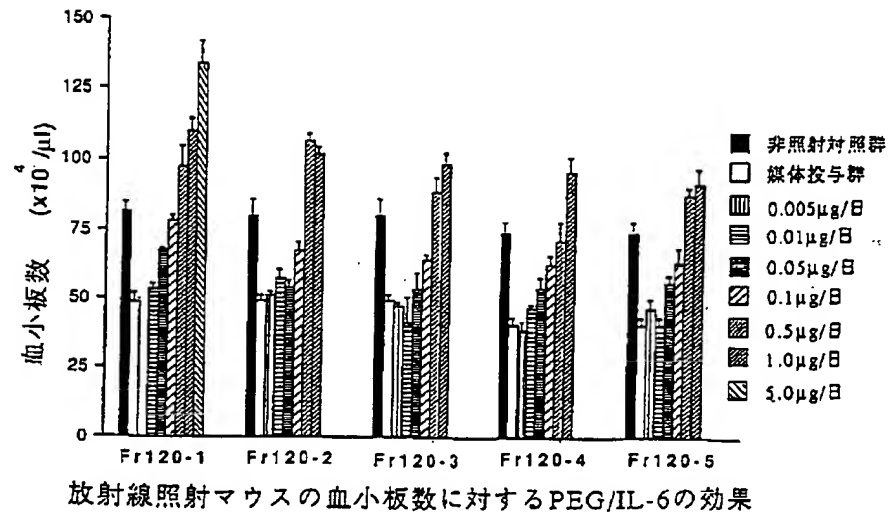


第 5 図

CY 投与後の末梢血中血小板数の変化

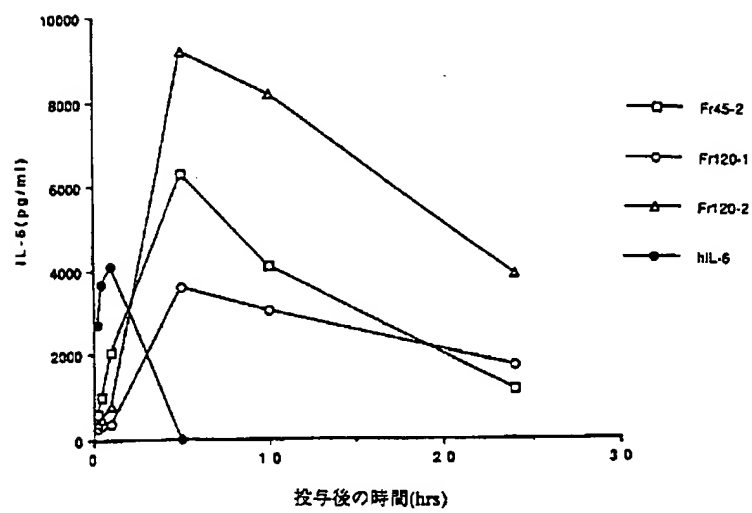


第 6 図



第 7 図

PEG/IL-6 およびhIL-6皮下投与後の血中濃度推移



第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

C 07 K 13/00

ZNA

7731-4H

優先権主張 ②平2(1990)8月22日③日本(JP)④特願 平2-222353

⑥発明者 井上 英男 群馬県前橋市総社町1-2-2 キリンビール株式会社医薬開発研究所内

手続補正書

平成3年1月24日
平成2年11月5日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第250460号

2. 発明の名称

修飾ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 キリン・アムジエン・インコーポレーテッド

4. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門1丁目15番7号

TG115ビル7階

氏名 (9109) 井上 英男

(ほか2名)

5. 補正命令の日付

目 発

6. 補正の対象

(1)代理権を証明する書面

(2)願書の出願人の代表者の欄

(3)明細書の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1)、(2)、別紙の通り

(3) ①明細書第6頁14行目「Okada et al.」を
「Okada, M. et al.」と訂正する。②明細書第7頁17行目「143:175」を「143:1175」
と訂正する。③明細書第14頁1行目、5行目、第20頁11～
12行目の「スクシニルイミド」を「スクシンイ
ミド」と訂正する。④明細書第20頁12～13行目「N-ヒドロキシスク
シニルイミド」を「活性型」と訂正する。⑤明細書第28頁下から3行目「82:7251」を
「82:5490」と訂正する。⑥明細書第34頁16～17行目「スクシニルイミド」
を「スクシンイミド」と訂正する。⑦明細書第34頁17～18行目「N-ヒドロキシス
クシニルイミド」を「活性型」と訂正する。方式
審査

(1)

特許庁
平成3年1月24日